N° d'enregistrement
au C.N.R.S.
A03587

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie

LA THÈSE

DE DOCTORAT ÈS SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

par

Madame Denise DAMAS

pour obtenir

le grade de Docteur Ès-Sciences

Sujet de la Thèse : Appareil génital et fécondation par voie hypodermique chez *Glossiphonia complanata* (L.) (Hirudinée, Rhynchobdelle). Étude histophysiologique.

Soutenue le 06 OCT. 1969 *devant la Commission d'Examen*

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Extrait du Bulletin de la Société Zoologique de France.
Tome 93, n° 3, 1968, p. 375.

Printed in France.

LES CELLULES GERMINALES MÂLES DE *GLOSSIPHONIA COMPLANATA* (L.), *(HIRUDINEE, RHYNCHOBDELLE).* ORIGINE, ÉVOLUTION ET STRUCTURE.

PAR

Denise DAMAS.

Chez *Glossiphonia complanata,* les cellules mâles de l'adulte naissent à partir de quelques éléments ciliés privilégiés de la paroi des sacs testiculaires.

L'auteur précise le cycle annuel des deux lignées de gonies ainsi que les caractères cytologiques de chaque stade.

On insiste sur la structure des spermatozoïdes mûrs, agglutinés en faisceaux. Neuf zones successives y ont été repérées ; parmi elles se situent probablement un stéréocil, antérieur au noyau, et le noyau lui-même, présentant tous deux des torsions.

The germinal male cells of *Glossiphonia complanata* (L.) (Rhynchobdellid leech). Origin, evolution and structure.

The male cells of the adult *Gl. complanata,* are elaborated from certain privileged ciliated elements of the testicle bags walls. The author specifies the annual cycle of the two lineages of gonias as well as the cytologic characters of each stage. Special attention is poid to the structure of the ripe spermatozoon, agglutinated in bundles. Nine successive zones have been discovered there, among vhich there is probably a stereocilia anterior to the nucleus and the nucleus itself, both twisted in structure.

On dénombre, à l'heure actuelle, deux types de travaux sur les cellules mâles des Hirudinées.

Tout d'abord les observations, relevant de la microscopie optique, définissent les stades évolutifs essentiels des gonies du point de vue cytologique ; citons à ce propos les noms de Wendrowsky (1928), Kulayeff (1938), Brake (1958), Nekhaev (1957, 1959), qui s'intéressent à divers genres de sangsues : *Branchiobdella, Acanthobdella, Protoclepsis, Glossiphonia, Hemiclepsis, Herpobdella, Haemopis, Hirudo.* J'ai décrit, pour ma part, chez *Glossiphonia complanata* (1964), les différentes étapes de la spermiogenèse et démontré l'origine golgienne de l'acrosome (ou *perforatorium*) du spermatozoïde ; j'ai, plus tard, décelé la présence de mucopolysaccharides neutres dans l'acrosome (1965 a).

Par ailleurs, les résultats fournis par la microscopie électronique sont relatifs à la membrane du noyau des cellules germinales jeunes (Baradany, 1961), ou plus récemment, à la structure du spermatozoïde mûr (Bondi, 1962 b) (Pastisson, 1965 et 1966) ; les deux genres étudiés sont *Hirudo* et *Branchiobdella*.

Cette note a pour but, comme étape préalable à une étude ultrastructurale, de décrire, par les voies cytologiques classiques, le cycle évolutif complet des gonies mâles de *Gl. complanata*, de leur origine à leur libération, ainsi que les détails de structure des faisceaux spermatiques mûrs.

Origine des cellules mâles.

A une période de repos couvrant l'automne, l'hiver et le printemps, succède, après la reproduction, qui a lieu en mai, une phase d'activité de l'épithélium testiculaire s'étendant sur juin et juillet. J'ai schématisé ces données sur la figure 1.

Kulayeff (1938) note le changement cyclique subi par l'épithélium pariétal des testicules de *Gl. complanata*. Les cellules, plates à l'origine, s'arrondissent, se divisent, puis se détachent pour tomber dans la cavité de la gonade, à l'état de jeunes spermatogonies.

La figure 2 illustre la forme aplatie de l'épithélium testiculaire en période de repos (décembre) ; toutes les cellules sont uniformément ciliées, ce qui avait échappé à Kulayeff. Or, ces cellules accusent, en période d'activité (juin), une double potentialité ; les unes restent ciliées en conservant leur caractère épithélial, les autres, après perte de la ciliature et divisions successives, fournissent des ilôts d'éléments mâles qui, sur la figure 3, évoluent en spermatogonies (spg.).

Précédemment, (1965 b), j'ai détecté dans les cellules ciliées, et à tous les moments du cycle génital, des orthophosphatases alcalines ; ce fait m'a conduite à émettre l'hypothèse d'un transfert, à travers les cellules de la paroi, de substances dont bénéficieraient les cellules mâles, privées sur place de tout autre tissu nourricier caractérisé ; les produits nutritifs pourraient être puisés aux dépens du contenu cœlomique voisin (fig. 2, cœl.). Les cellules ciliées de la paroi des sacs ont certainement une importance fonctionnelle capitale : elles assureraient sous une forme banale, en priorité et tout au long de l'année, la nutrition des cellules germinales ; certaines d'entre elles seulement, perdant leur ciliature juste après l'époque de l'accouplement, sont à l'origine des cellules-souches mâles.

Double évolution des cellules caduques.

Chez les individus adultes, âgés de un à quatre ans, les cellules, libérées de l'épithélium germinatif, se divisent tout en restant cohérentes, elles simulent une sorte de morula et sont, en fin de compte, rangées autour d'un reliquat protoplasmique central ou cytophore (fig. 5, cyt.).

Leur destin possible est double chez *Gl. complanata* (KULAYEFF, 1938), et, de son côté, NEKHAEV (1957) a fait la même constatation chez *Hirudo*.

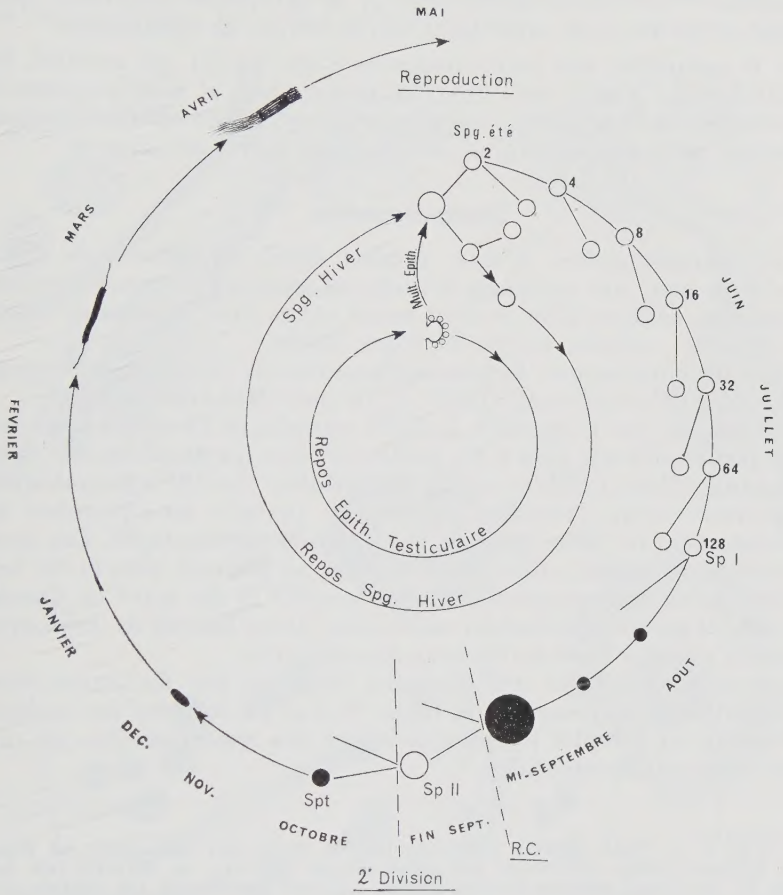


FIG. 1. — Cycle annuel de l'évolution de la double lignée des gonies mâles de *Glossiphonia complanata*. On a figuré sur le dessin le cycle de l'épithélium testiculaire et ses relations avec les gonies.

mult. épith. = multiplication de l'épithélium de la paroi des testicules, R.C. = réduction chromatique, Sp. I = spermatocyte de premier ordre, Sp. II = spermatocyte de deuxième ordre, Spg. = spermatogonie, Spt. = spermatide.

En effet, parmi ces cellules, *les spermatogonies d'été* (fig. 1) vont évoluer normalement en spermatozoïdes ; d'autres, *les spermatogonies d'hiver*, sont stockées, et ne sortiront de leur état latent que l'année suivante.

Les deux catégories s'opposent par des différences saillantes :

— *le cytophore des spermatogonies d'hiver* (fig. 4) est nucléé, riche en RNA et en inclusions diverses. Les cellules germinales de ce type possèdent un noyau à gros nucléole et de nombreuses mitochondries ; les limites entre elles et le cytophore nourricier sont floues, ce qui favorise sans doute des échanges de substances.

— *le cytophore des spermatogonies d'été* (fig. 5), est anucléé, les gonies ont un noyau sans nucléole perceptible, et sont pauvres en mitochondries ; la limite entre elles et le cytophore est franchement marquée, et ce dernier semble uniquement servir de support.

Spermatogenèse

Les spermatogonies, d'hiver comme d'été, se divisent de façon synchrone pour une catégorie donnée, au moment propice à chacune d'elles. Les cellules filles restent unies entre elles en masses comptant 4-8-16-... cellules toutes au même stade.

Chez *Gl. complanata*, le nombre haploïde de chromosomes serait de 13 pour WENDROWSKY (1928) et 19 pour KULAYEFF (1938).

J'ai retracé, sur la figure 1, le cycle complet de l'évolution des cellules germinales. De juin à fin juillet ont lieu les divisions des spermatogonies d'été, jusqu'au stade 128 cellules. Ces 128 spermatocytes de premier ordre subissent en août et jusqu'à mi-septembre un accroîssement de taille suivi de la réduction chromatique. Les spermatocytes de second ordre, ainsi formés, se divisent vers la fin septembre. Leur spermiogenèse s'étend jusqu'à la fin mars de l'année suivante. Les spermatozoïdes mûrs sont alors libérés de leur cytophore et passent dans les canaux éjaculateurs.

Les quelques stades des divisions observés par KULAYEFF, sont notés entre parenthèses sur la figure 7. J'ai pu combler les lacunes, et fournir au complet les images allant des spermatocytes de premier ordre aux spermatides.

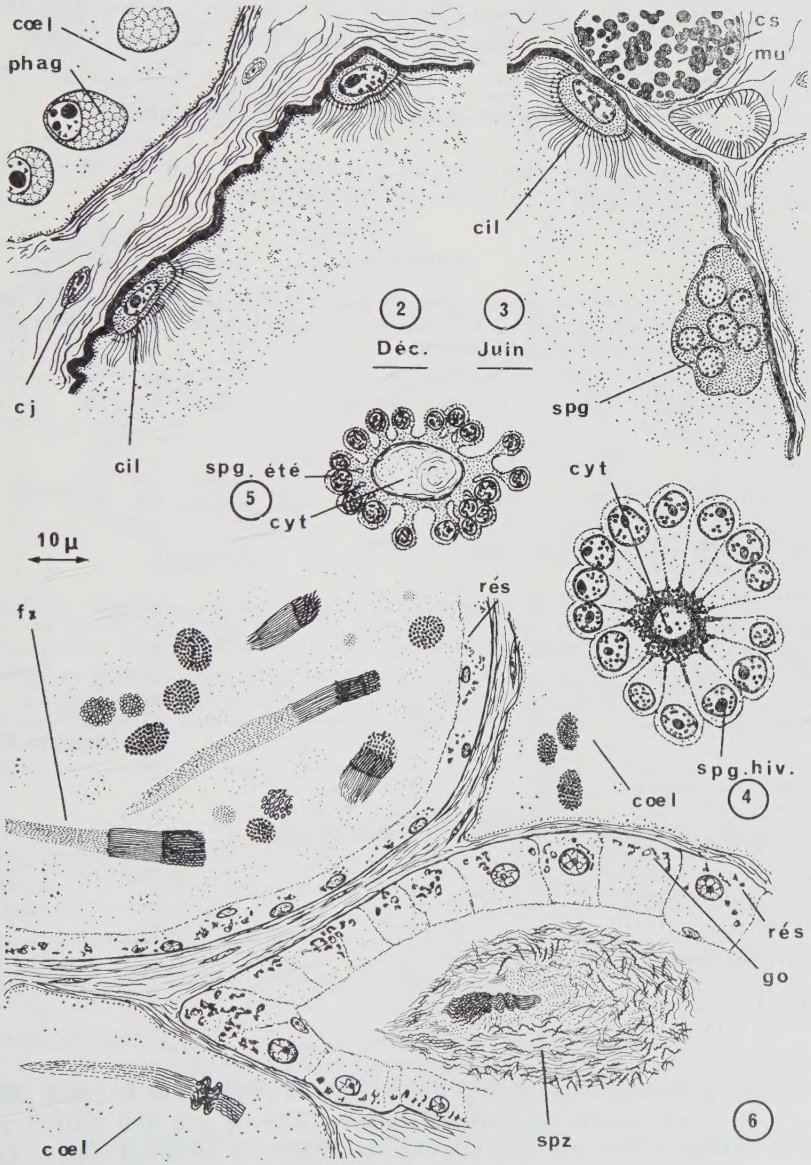
FIG. 2 et 3. — Deux aspects présentés par la paroi des testicules. Au repos, en décembre (fig. 2), toutes les cellules sont ciliées ; en activité, en juin (fig. 3), quelques cellules restent ciliées, d'autres fourniront les jeunes spermatogonies.

FIG. 4 et 5. — Différence entre les spermatogonies d'été (fig. 5), supportées par un cytophore anucléé, et les spermatogonies d'hiver (fig. 4), en étroit contact avec leur cytophore nourricier, nucléé.

FIG. 6. — Coupe de deux régions du réservoir séminal, traitée par une technique d'imprégnation argentique. Les spermatozoïdes, d'abord enchevêtrés en peloton (spz), se groupent ensuite en faisceaux (fx). Dans le cœlome, on rencontre des faisceaux provenant du partenaire. Celui du bas, pressé dans une lacune cœlomique, présente un tassement de la région nucléaire, alors que le segment prénucléaire semble rigide.

cil. = cellule ciliée de la paroi du testicule, cj. = conjonctif, coel. = coelome, cs. = cellule à sphérules, du conjonctif, cyt. = cytophore, fx. = faisceau de spermatozoïdes, go. = corps de Golgi, mu. = muscle, rés. = réservoir séminal, phag. = phagocyte, spg. = spermatogonies, spg. été = spermatogonies d'été, spg. hiv. = spermatogonies d'hiver, spz. = spermatozoïdes.

Les étapes ultérieures, de spermiogenèse, ont déjà fait l'objet d'une note (1964) que je résumerai brièvement. Le noyau arrondi des cellules s'allonge en même temps qu'il se colore en masse. Le spermatozoïde présente ainsi un corps nucléaire en baguette, déprimé sur une face par une enclave cytoplasmique encore indéterminée qui disparaît dans les stades ultimes. Il existe trois organites sidéro-



philes, assimilés à des centrosomes : deux, antérieurs, sont reliés à un filament pré-nucléaire, tandis que le troisième, postérieur, est uni au flagelle. Ces formations filamenteuses atteignent leur développement maximum dans le spermatozoïde mûr. En même temps s'élabore, à l'avant de la cellule germinale et au sein de l'appareil de golgi, un acrosome bien individualisé.

Après libération des gonies, il subsiste dans les testicules, d'une part les cytophores, qui, sans tarder, deviennent la proie des phagocytes, d'autre part les spermatogonies d'hiver, à l'état latent.

Passage du sperme dans les canaux éjaculateurs.

Les spermatozoïdes vont cheminer maintenant le long des canaux mâles et y subir leurs dernières différentiations.

TABLEAU.

Résultats histo- et cytologiques relatifs aux 9 zones décrites dans le faisceau de spermatozoïdes de Glossiphonia complanata. *Ces 9 zones sont celles mentionnées sur la figure 8.*

Zones du faisceau	I	II	III	IV V VI	VII	VIII	IX
Feulgen-Rossenbeck	← segment pré-nucléaire →				DNA noyau	← sg. post-nucl. →	
Unna-Brachet (vert de méthyle-pyronine.....					bleuâtre		
Bleu de toluidine tamponné.....					verdâtre		
Altmann-Gabe.....						mitoch. p. intermé.	flagelle
Imprégnation argentique (Cajal) = argyrophilie.....		+	←	++ ± + → "stéréocil" rigide			+
Imprégnation osmique (Champy-Kolatchev).....							résidus golgiens
Trichr. De Prenant.	mucus						
Histochimie (Damas 1965 a).....		m. p. s. neutre					

D'abord groupés en peloton dans le canal efférent et le canal déférent, ils sont ensuite agglutinés en faisceaux de 2 à 300 unités, par la sécrétion muqueuse des glandes du réservoir séminal (fig. 6, fx.).

KULAYEFF reconnaît trois zones dans un faisceau mûr : un corps nucléaire, une région prénucléaire portant l'acrosome, une queue. J'y ai, pour ma part, défini neuf zones, à chacune desquelles j'ai pu attribuer une signification.

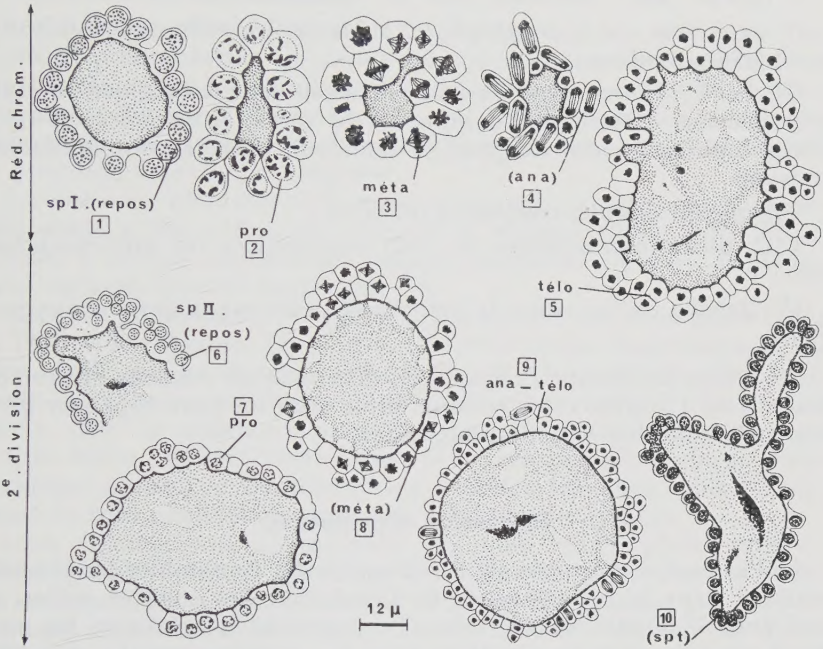


FIG. 7. — Cytologie nucléaire des stades successifs de la réduction chromatique et de la deuxième division des cellules mâles de *Glossiphonia complanata*. Les stades entre parenthèses, sont ceux déjà décrits par KULAYEFF (1938).

ana. = anaphase, ana-télo. = ana- et télophases, méta. = métaphase, pro. = prophase, sp. I = spermatocyte de premier ordre, sp. II = spermatocyte de deuxième ordre, spt. = spermatide, télo. = télophase.

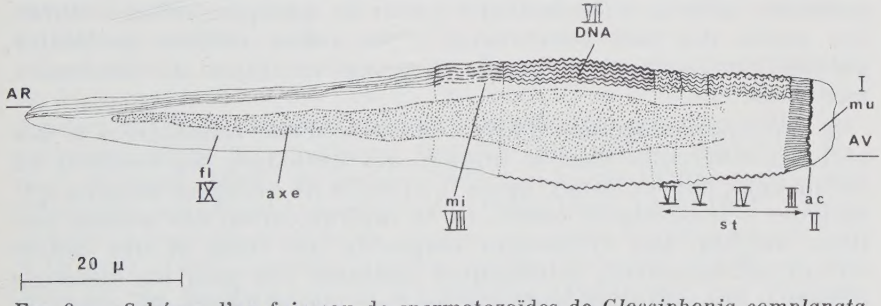


FIG. 8. — Schéma d'un faisceau de spermatozoïdes de *Glossiphonia complanata*. De l'avant (AV) vers l'arrière (AR) on trouve 9 zones successives numérotées de I à IX.

ac. = acrosome, AR = arrière, AV = avant, DNA = acide désoxyribonucléique du noyau, fl. = flagelle, mi. = mitochondries, mu. = mucus, st. = stéréocil.

Le tableau I rassemble les résultats histologiques et cytologiques sur lesquels j'ai étayé cette identification. On se reportera également à la figure 8 où les zones successives sont numérotées de I à IX.

I. mucus (mu.) enrobant tous les spermatozoïdes ;

II. acrosome (ac.), argyrophyle, sidérophile, riche en mucopolysaccharides neutres ;

III, IV, V, VI. ces quatre zones correspondent au segment ondulé prénucléaire, assimilable, comme on le verra, à un stéréocil (st.). L'argyrophilie en est variable et détermine quatre compartiments tranchés ;

VII. noyau ondulé, contenant du DNA ;

VIII. pièce intermédiaire où sont rassemblées les mitochondries (mi.) ;

IX. flagelle (fl.) et reste de cytoplasme contenant des résidus golgiens.

Au centre de chaque faisceau, on distingue un *nucleus* granuleux (axe), dont l'origine est inconnue, mais dont on peut supposer qu'il assure la cohésion des spermatozoïdes.

Discussion. Conclusion.

1. J'ai essayé, à propos de *Gl. complanata*, de combler les lacunes existant dans la connaissance de l'évolution des cellules mâles, et ceci pour l'instant, par les voies classiques de la cytologie. En confrontant mes propres résultats avec les renseignements recueillis par divers auteurs, j'ai pu me faire une idée de l'ensemble du développement de la lignée mâle, depuis son origine jusqu'à sa libération dans les canaux évacuateurs, et fournir ainsi la première description complète chez cette espèce.

2. A propos de l'origine des gonies, j'ai mis en évidence un fait nouveau : elles se différencient à partir de quelques cellules ciliées des parois des sacs testiculaires ; les autres cellules pariétales gardent leur morphologie banale et servent au transit de substances nutritives.

3. Les spermatogonies d'hiver et celles d'été, rencontrées à des périodes différentes dans la lumière des testicules, représentent en réalité deux lignées issues, après la division de quelques cellules épithéliales primitivement ciliées, de la multiplication des mêmes cellules souches. Les cytophores respectifs des unes et des autres offrent des caractères cytologiques distincts liés pour les éléments d'hiver à une évolution lente (un an avec longue phase de repos), et pour les éléments d'été, à leur développement immédiat. Les cytophores d'hiver, nucléés, riches en constituants cytoplasmiques, et en réserves, jouent un rôle nourricier ; ceux d'été, sans noyau ni

inclusions et limités nettement, ne sont plus que des supports. Il en résulte qu'à chaque période de reproduction annuelle, les spermatozoïdes mûrs dérivent simultanément d'un lot de spermatogonies de l'année précédente et d'un lot d'une nouvelle lignée de mai, la seconde entrant en sommeil.

4. Le spermatozoïde mûr, enfin, comportant un acrosome, un segment prénucléaire, un noyau suivi d'une pièce intermédiaire, et un flagelle, répond à un plan répandu dans de nombreuses espèces animales. Toutefois, l'organisation en faisceau est assez spéciale pour avoir été explorée en détail, et pour les sangsues, j'en fournis la première description complète.

La présence d'un stéréocil dans le segment prénucléaire du spermatozoïde a été défini par Grassé et Tuzet (1932), puis Tuzet (1950), à propos de diverses espèces animales. On sait d'ailleurs, qu'il manque dans de nombreux cas.

Chez les Hirudinées, un stéréocil fut signalé par Pastisson (1965 et 1966) chez *Hirudo*. En utilisant le microscope électronique, l'auteur révèle que ce segment présente la structure ciliaire caractéristique (neuf paires d'éléments autour d'un axe central). De plus, il existe, dans la substance nucléaire, une structure enigmatique en double hélice ; en arrière du noyau se trouve une pièce intermédiaire classique garnie de mitochondries à crêtes franches, puis en élément de type centriolaire, enfin un long flagelle typique.

Chez *Glossiphonia complanata*, j'ai noté l'argyrophilie plus ou moins accentuée selon les zones, des segments prénucléaires ondulés des spermatozoïdes, et surtout leur rigidité relative par rapport au reste du faisceau. Cette propriété est mise en évidence dès qu'un faisceau est soumis à une pression mécanique (fig. 6, en bas). Il est très vraisemblable qu'il s'agit de stéréocils, je le vérifierait par la microscopie électronique. Toutefois, il ne semble pas y avoir interpénétration entre le segment antérieur du spermatozoïde et l'acrosome, comme c'est le cas pour *Hirudo*. La structure en double hélice signalée par Pastisson au sein du noyau spermatique de cette sangsue, paraît trouver son équivalent dans la région nucléaire ondulée des cellules mâles mûres de *Gl. complanata*.

Le caractère spiralé propre à ces deux régions du spermatozoïde de *Gl. complanata*, n'est pas un fait isolé. Il se rencontre dans des groupes variés et affecte d'autres structures que le noyau, telles que acrosome, pièce intermédiaire, flagelle. Citons à cet égard les travaux d'André (1962), de Bondi (1962, a et b) sur l'Oligochète *Branchiobdella pentodonta*, de Franzen (1955, 1956, 1962, 1967) sur de nombreux invertébrés dont la sangsue du genre *Xironogiton*, de Lee et Wilkes (1965) sur des Insectes, de Mac Farlane (1963) sur des Oiseaux, de Southward et Southward (1963) sur des Pogonophores, de Yasuzumi et Tanaka (1958) sur des Mollusques etc...

Une telle torsion n'avait, par contre, jamais été signalée, à ma connaissance, dans le noyau, sauf par Pastisson (1965, 1966) chez *Hirudo*. Ce que j'ai observé chez *Gl. complanata* constituerait un second exemple.

Rothschild (1953) a établi, pour quelques Mammifères, le lien entre cette architecture hélicoïdale et le mouvement rotatif du sperme. Cette conception pourrait aussi s'appliquer au cas qui nous intéresse et à bien d'autres, d'autant qu'une telle structure semble plus répandue qu'on ne le croyait.

Laboratoire de Cytologie de la Faculté des Sciences de Paris, 7 Quai Saint Bernard, Paris V^e^.

Bibliographie.

André, J. (1962). — Contribution à la connaissance du chondriome. Etude de ses modifications ultrastructurales pendant la spermatogenèse. *J. Ultrastr. Res.*, suppl., 3, 1-185.

Baradany, N. (1961). — Organisation ultramicroscopique de la membrane nucléaire de la spermatide de la Sangsue (*Hirudo medicinalis*). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 253, 1127-1129.

Bondi, C. (1962, a). — Osservazioni sull' apparato sessuale maschile in *Branchiobdella pentodonta* Whitman. *Rivista di biologia*, 55, 7-36.

Bondi C. (1962, b). — Indagini morfologiche sugli spermi di *Branchiobdella pentodonta* Whitman, eseguite mediante microscopio elettronico. *Riv. di biologia*, 55, 177-186.

Brake, Z. (1958). — *Hirudo medicinalis* spermatogeneze. *Latv. P.S.R. Zinat. Akad. Vestis*, 3, 99-106.

Damas, D. (1964). — Elaboration de l'acrosome au cours de la spermiogenèse de *Glossiphonia complanata* (L.), (Hirudinée, Rhynchobdelle). *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 89, 669-673.

Damas, D. (1965, a). — Présence d'un mucopolysaccharide neutre dans l'acrosome du spermatozoïde de *Glossiphonia complanata* (L.), (Hirudinée, Rhynchobdelle). *Annales Histochem.*, 10, 11-16.

Damas, D. (1965, b). — Répartition des orthophosphates alcalines chez une Hirudinée : *Glossiphonia complanata* (L.). *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 90, 385-391.

Franzén, Å. (1955). — Comparative morphological investigations in the spermiogenesis among Mollusca. *Zool. Bidr., Uppsala*, 30, 399-456.

Franzén, Å. (1956). — On the spermatogenesis morphology of the spermatozoon and biology of fertilization among invertebrates. *Zool. Bidr., Uppsala*, 31, 355-482.

Franzén, Å. (1962). — Notes on the morphology and histology of *Xironogiton instabilia* (Moore, 1893) (fam. Branchiobdellidae) with special reference to the muscle cells. *Zool. Bidr., Uppsala*, 35, 369-384.

Franzén, Å (1967). — Spermiogenesis and spermatozoa of the Cephalopoda. *Ark. Zool. Sverige*, 19, 323-334.

Grassé, P. P. et Tuzet, O. (1932). — Sur la spermatogenèse du Sélacien *Scyllium canicula* Cuv. *C. R. Soc. Biol.*, 111, 279-282.

Kulayeff, S. I. (1938). — Cyclomorphosis of the male reproductive apparatus and the spermatogenesis in *Glossiphonia complanata*. *Arch. Russ. Anat. Histol. Embryol., Leningrad*, 18, 353-388.

Lee, P., Wilkes, A. (1965). — Polymorphic spermatozoa in the Hymenopterous Wasp *Dahlbomius*. *Science*, 147, 1445-1446.

Mac Farlane, R. W. (1963). — The taxonomic significance of avian sperm. *Proc. XIIIth. Int. Ornithol. Congr.*, 91-102.

Nekhaev, V. M. (1957). — Le problème de la spermatogenèse chez la sangsue officinale. *Zh. Obshch. Biol., SSSSR*, 18, 208-216.

Nekhaev, V. M. (1959). — Cycle annuel du développement des testicules chez la sangsue officinale (*Hirudo officinalis*) et la sangsue *Haemopis sanguisuga* (Berg.). *Zool. Zh., SSSR*, 38, 280-282.

PASTISSON, C. (1965). — Recherches préliminaires sur l'ultrastructure du spermatozoïde de la Sangsue, *Hirudo medicinalis* L. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 261, 2950-2953.

PASTISSON, C. (1966). — Anatomie ultrastructurale du spermatozoïde de la Sangsue,*Hirudo medicinalis* L. *Ann. Univ. A.R.E.R.S., Reims*, 4, 67-75.

ROTHSHILD Lord, (1953). — The movement of spermatozoa. In Mammalian germ cells. A. *Ciba Foundation symposium, Boston.*

SOUTHWARD, A. J., SOUTHWARD, E. C. (1963). — Notes on the biology of some Pogonophora. *J. of the marine biol. Assoc.*, 43, 57-64.

TUZET, O. (1950). — Le spermatozoïde dans la série animale. *Rev. Suisse Zool.*, 57, 433-451.

WENDROWSKY, V. (1928). — Uber die Chromosomkomplexe der Hirudinen. *Zeitschr. Wiss. Biol. Abt. B. Zeitschr. Zellforsch. u. Mikrosk. Anat.*, 8, 153-175.

YASUZUMI, G., TANAKA, H. (1958). — Spermatogenesis in animals revealed by electron microscopy. VI. Researches on the spermatozoon dimorphism in a pond Snail, *Cipangopaludina malleata. P. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4, 621-632.

IMPRIMERIE M. DECLUME, LONS-LE-SAUNIER.

Printed in France.